

② 公開特許公報 (A)

昭56—154967

⑤ Int. Cl. ³	識別記号	庁内整理番号	④ 公開 昭和56年(1981)11月30日
A 23 L 1/236		7236—4B	
C 07 H 3/06		7252—4C	発明の数 2
C 12 P 19/18		6712—4B	審査請求 未請求
/(C 12 P 19/18			
C 12 R 1/645)			
(C 12 P 19/18			
C 12 R 1/66)			
(C 12 P 19/18			
C 12 R 1/77)			

(全 9 頁)

⑤ 甘味料およびその製造法

⑦ 発 明 者 日高秀昌

浦和市岸町 6 の16の11

② 特 願 昭55—40193

⑦ 出 願 人 明治製菓株式会社

② 出 願 昭55(1980) 3 月31日

東京都中央区京橋 2 丁目 4 番16
号

⑦ 発 明 者 足立堯

⑦ 代 理 人 弁理士 久保田藤郎

横浜市金沢西柴168の11

明 細 書

1. 発明の名称

甘味料およびその製造法

2. 特許請求の範囲

1. 組成物中、シユークロースにフラクトースが 1 ～ 4 分子結合したオリゴ糖類を含有する難う蝕性甘味料。

2. 総固形分中のシユークロースの含有率(重量%)に対して、シユークロースにフラクトースが 1 ～ 4 分子結合したオリゴ糖類の合計含有率(重量%)の比が 2.0 以上である特許請求の範囲第 1 項記載の甘味料。

3. シユークロースにフラクトシルトランスフェラーゼを作用させることを特徴とする難う蝕性甘味料の製造法。

4. アスペルギルス (*Aspergillus*) 属の生産するフラクトシルトランスフェラーゼを用いる特許請求の範囲第 3 項記載の製造法。

5. フザリウム (*Fusarium*) 属の生産するフラク

トシルトランスフェラーゼを用いる特許請求の範囲第 3 項記載の製造法。

6. グレオスポリウム (*Gloeosporium*) 属の生産するフラクトシルトランスフェラーゼを用いる特許請求の範囲第 3 項記載の製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明はシユークロースにフラクトシルトランスフェラーゼを作用させて得られるオリゴ糖で、それを組成的にみると、シユークロースにフラクトースが 1 分子～ 4 分子結合したオリゴ糖を含有する難う蝕性甘味料並びにその製造法に関するものである。

従来、シユークロースはその良質な甘味とボデュー感、結晶性等々の優れた特質を生かして広く菓子、食品に应用されている。しかしながら、シユークロースは口中微生物によって生産されるデキストランシユークラーゼの基質となり、この結果、シユークロースを連続採取すると口中に不溶性デキストランが多量に生成し、歯苔形成が促進されるので、虫歯誘発の原因になると云われてい

る。

本発明者らは、シユークロースの持つ優れた性質を生かしつつ、虫歯誘発の原因となりにくいシユークロース関連糖質につき鋭意検討の結果、シユークロースにフラクトシルトランスフェラーゼを作用させて得られるオリゴ糖群、すなわちシユークロースにフラクトースが1分子結合した物質（以下、GF₂と称する。）、シユークロースにフラクトースが2分子結合した物質（以下、GF₃と称する。）、シユークロースにフラクトースが3分子結合した物質（以下、GF₄と称する。）、シユークロースにフラクトースが4分子結合した物質（以下、GF₅と称する。）等のオリゴ糖がストレプトコッカス・ムタンス（*Streptococcus mutans*）等の口中微生物の生産するデキストランシユークラーゼの作用を受けなければ、デキストランシユークラーゼによるシユークロースからの不溶性デキストランの生成をも抑制する効果があることを知った。ここで用いたGF₂、GF₃、GF₄、GF₅等のオリゴ糖は、シユークロースにフラクトシルトラ

- 3 -

ている不溶性デキストランの生成量が少ないこと並びにGF₂、GF₃等のオリゴ糖自体がシユークロースからのデキストラン生成を抑制すること等の特性を有している。

さらに本組成物は難う蝕性であるとともに、良質な甘味、適度なボディ感、保湿性等の甘味料としてのすぐれた特性をも有するものである。

以上の様に、成分中にシユークロースにフラクトースが1分子～4分子結合したオリゴ糖を含有する組成物（以下、難う蝕性甘味料と称す。）は、虫歯誘発の原因になりにくい甘味組成物であるが、本発明者らはこの難う蝕性甘味料の工業的製造法についても鋭意検討を加え、第2の発明を完成した。すなわち、シユークロースにフラクトシルトランスフェラーゼを作用させるることによって該甘味料を得ることができる。

この第2の発明に用いられるフラクトシルトランスフェラーゼは主としてシユークロースに作用してフラクトースとグルコースとのβ-1,2結合を切断した後、そのフラクトースをシユークロー

ンスフェラーゼを作用させて得られる転移糖組成物から、たとえばカーボンクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等の手段で単離精製できるが、実用的にはこれらのオリゴ糖の組成物を用いることが好ましく、このような転移糖組成物は、その成分中に未反応のシユークロース、転移反応により生成したGF₂、GF₃等のオリゴ糖並びに転移反応により副成したグルコース等を含有するものである。

しかしながら、このような転移糖組成物もまた口中微生物のデキストランシユークラーゼの作用を受けにくく、その結果、不溶性デキストランの生成量も少ない。これは組成物中にシユークロースが存在してもGF₂、GF₃等のオリゴ糖が、シユークロースからの不溶性デキストランの生成を抑制し、またGF₂、GF₃等のオリゴ糖からは不溶性デキストランが生成しないことによるものである。

このように、成分中にシユークロースにフラクトースが1分子～4分子結合したオリゴ糖を含有する組成物は、それ自体虫歯発生の主要因とされ

- 4 -

スに転移してGF₂を生じ、さらにGF₂にフラクトースを転移してGF₃を生成する作用を有する。反応生成物がこのようにGF₂、GF₃等のごとくシユークロースにフラクトースが結合したオリゴ糖である点で、エンザーム・ノーメンクラチュア（Enzyme Nomenclature）（Academic Press, 1978年）記載のイヌロシユークラーゼ（Inulosucrase）〔2.4.1.9〕やレバンシユークラーゼ（Levanucrase）〔2.4.1.10〕と異なっている。

この酵素はアスペルギルス（*Aspergillus*）属（アスペルギルス・ニガー（*Aspergillus niger*）〔The genus *Aspergillus*, ウィリアムス アンド ウィルキンソン コーポレーション, 1965年, 293頁〕等）、ペニシリウム（*Penicillium*）属（ペニシリウム・ニグリカンス（*Penicillium nigricans*）等）、フザリウム（*Fusarium*）属（フザリウム・リニ（*Fusarium lini* IAM 5008）等）、グレオスポリウム（*Gloeosporium*）属（グレオスポリウム・カキ（*Gloeosporium kaki* IAM 5011）等）などのカビ、サツカロミセス（*Saccharomyces*）属（サツカロミセス・セレビシエ（*Saccharo-*

- 5 -

- 6 -

myces cerevisiae)等), ロドトルラ (*Rhodotorulla*) 属 (ロドトルラ・グルチニス (*Rhodotorulla glutinis*) 等), ビヒア (*Pichia*) 属 (ビヒア・ミソ (*Pichia miso*) 等), ハンゼヌラ (*Hansenula*) 属 (ハンゼヌラ・ミソ (*Hansenula miso*) 等), キャンディダ (*Candida*) 属 (キャンディダ・トロピカリス (*Candida tropicalis*) 等) などの酵母等の微生物起源の酵素やアスバラガス, キクイモ等の植物起源の酵素が用いられる。微生物起源のフラクトシルトランスフェラーゼは適当な培地、たとえばシュクロース 5.0%, ペプトン 1.0%, 肉エキス 0.7%, NaCl 0.5% を含有する培地にそれぞれの微生物の至適温度、すなわち 25 ~ 30℃ で 24 ~ 96 時間培養し、培養終了後、菌体を濾過または遠心分離等の手段で除去した培養液、さらにはこの培養液より限外濾過法、硫酸塩析法、溶剤沈殿法、ゲル濾過法、イオン交換クロマト法等の酵素精製に関する常法によって精製純化した酵素を用いることができる。また植物起源の酵素は植物組織を摩砕等の物理的手段により破壊した後、酵素

- 7 -

した後、濃縮して目的^物を得る。転移組成物の分析は、たとえばマイクロボンダパック CH カラム (ウオーターズ・リミテッド製) を用い、アセトニトリル: 水 (80:20 (v/v)) の溶剤系を用いた高速液体クロマトグラフィー法で行なうことができる。

このようにして得られた難う蝕性甘味料の組成は、たとえばグルコース 30%, シュクロース 11%, GF₂ 2.8%, GF₃ 2.5%, GF₄ 5%, GF₅ 1% であるが、それぞれの構成糖の組成は反応条件により種々の値をとり得る。

オリゴ糖の GF₂ としては O-β-D-フラクトフラノシル-(2→1)-O-β-フラクトフラノシル-(2→1)-α-D-グルコピラノシド, O-β-D-フラクトフラノシル-(2→6)-O-β-グルコピラノシル-(1→2)-β-D-フラクトフラノシド, O-β-D-フラクトフラノシル-(2→6)-O-β-フラクトフラノシル-(2→1)-α-D-グルコピラノシド等があり、GF₃ としては O-β-D-フラクトフラ

- 9 -

ノシル-(2→[1-O-β-D-フラクトフラノシル]₂→1)-α-D-グルコピラノシド, O-β-D-フラクトフラノシル-(2→6)-O-[β-D-フラクトフラノシル-(2→2)]-O-α-D-グルコピラノシル-(1→2)-β-D-フラクトフラノシド等があり、GF₄ としては O-β-D-フラクトフラノシル-(2→[1-O-β-D-フラクトフラノシル-2]₃→1)-α-D-グルコピラノシド等がある。

次に、本発明の甘味料並びにその成分である GF₂, GF₃, GF₄, GF₅ の効果について実験例を示して詳細に説明する。

ストレプトコッカス・ムタンス (*Streptococcus mutans*) ATCC 25175 株を培養して得たデキストランシュクララーゼを用いて GF₂, GF₃, GF₄, GF₅ からの不溶性デキストランの生成量をシュクロースと比較したものが後記試験例 1 における表 1 である。表から明らかなように、GF₂, GF₃, GF₄, GF₅ からは不溶性デキストランは全く生成しなかつた。

- 8 -

次に、本発明の甘味料並びにその成分である GF₂, GF₃, GF₄, GF₅ の効果について実験例を示して詳細に説明する。

ストレプトコッカス・ムタンス (*Streptococcus mutans*) ATCC 25175 株を培養して得たデキストランシュクララーゼを用いて GF₂, GF₃, GF₄, GF₅ からの不溶性デキストランの生成量をシュクロースと比較したものが後記試験例 1 における表 1 である。表から明らかなように、GF₂, GF₃, GF₄, GF₅ からは不溶性デキストランは全く生成しなかつた。

ストレプトコッカス・ムタンス (*Streptococcus mutans*) ATCC 25175 株を培養して得たデキストランシュクララーゼを用いて GF₂, GF₃, GF₄, GF₅ からの不溶性デキストランの生成量をシュクロースと比較したものが後記試験例 1 における表 1 である。表から明らかなように、GF₂, GF₃, GF₄, GF₅ からは不溶性デキストランは全く生成しなかつた。

同様に GF_2 , GF_3 がデキストランシユークラーゼによるシユークロースからの不溶性デキストランの生成を抑制するか否かの検討を行なった結果を後記試験例2に表-2として示してある。表から明らかなように、 GF_2 と GF_3 はいずれもシユークロースからの不溶性デキストランの生成を抑制していることが判った。

また種々の転移条件で組成の異なった甘味料を調製し、この組成物からの不溶性デキストランの生成量をシユークロースと比較したものが後記試験例3における表-4である。この表から判るように、シユークロースと比較していずれの組成物においても不溶性デキストランの生成量が低い。特に、該甘味料組成物の総固形分重量におけるシユークロースの含有率(重量%)に対しての GF_2 , GF_3 , GF_4 等のオリゴ糖の合計含量(重量%)が2倍以上、すなわち総固形分中のシユークロース含有率(重量%)に対するオリゴ糖類の合計含有率(重量%)の比が2.0以上の場合には、不溶性デキストランの生成量はシユークロースの50%以

- 11 -

単一スポットを与える分画を用いた。結果を表-1に示す。

表 - 1

試 料 名	反応液中に生成したデキストラン(%)
シユークロース	74.0
GF_2	0
GF_3	0
GF_4	0
GF_5	0

表-1に示すように、 GF_2 , GF_3 , GF_4 , GF_5 からのデキストランの生成は認められなかった。

試験例2

試験例1において調製したデキストランシユークラーゼを用いてシユークロースの存在下に GF_2 , GF_3 を添加したときにシユークロースからの不溶性デキストランの生成を GF_2 , GF_3 が抑制するか否かを調べた。なお、反応条件は糖液 1.0 ml (それぞれ表-2に記載の糖質を含む), 0.67 M 磷酸

- 13 -

下となり、実用的に好ましい。

試験例1

ストレプトコッカス・ムタンス (*Streptococcus mutans*) ATCC 25175株をグルコース, トリプトケースを含有する培地で嫌氣的条件下に培養し、菌体を除去した後、限外濾過法により濃縮, 精製してデキストランシユークラーゼを調製した。

次いで1%糖液 1.0 ml, 0.67 M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 1.5 ml, 上記酵素液 0.25 ml を混合し 37℃で4時間反応せしめた後、生成した水不溶性デキストランを3,000 rpm で15分間遠沈して沈殿部分を集め、これを70%エタノール 5 ml で2回洗浄後、2.5 ml の 1 M - KOH 溶液に溶解し、フェノール-硫酸法によりデキストラン生成量を定量した。なお、糖液としてシユークロース, GF_2 , GF_3 , GF_4 , GF_5 のそれぞれ1%溶液を用いた。 GF_2 , GF_3 , GF_4 , GF_5 はシユークロースにフラクトシルトランスフェラーゼを作用させて得た転移糖組成物を原料として、これをカーボンクロマト法により分画精製し、薄層クロマトグラフィーにより

- 12 -

緩衝液 (pH 7.0) 1.5 ml, 酵素液 0.25 ml をそれぞれ混合し、37℃で4時間反応後、試験例1と同じ方法で反応液中に生成する不溶性デキストランを定量した。

表 - 2

反応液中の糖含量	反応液中のデキストラン生成量 (r)
シユークロース 10mg	74.0 (100)
シユークロース 10mg + GF_2 3.0mg	3.00 (4.0)
シユークロース 10mg + GF_3 3.0mg	3.50 (4.7)

なお、表-2中における()内の数字はシユークロースからの不溶性デキストランの生成量を100とした場合の指数を示している。

試験例3

シユークロースにフラクトシルトランスフェラーゼを種々の条件で作用させ下記の組成を持つ甘味料を製造した。

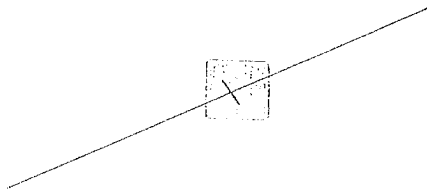
- 14 -

表 3

瓶	フラクトース	グルコース	シユークロース	GF ₂	GF ₃	GF ₄	比率*
1	—	59	81.9	122	—	—	15.0
2	—	13.7	58.5	27.8	—	—	47.5
3	—	17.4	41.8	35.7	5.0	—	97.0
4	—	23.5	23.9	41.2	11.4	—	22.0
5	—	28.4	14.9	39.2	17.4	—	38.0
6	0.8	31.5	11.0	26.4	25.1	5.0	51.4

$$* \frac{GF_2 + GF_3 + GF_4 (\%) }{シユークロース (\%)} \times 100$$

試験例 1 と同様の方法で上記転移糖組成物からの不溶性デキストランの生成量を測定したところ表 4 のような結果が得られた。



- 15 -

1965年, 293頁] 1白金耳を植菌し、28℃で24時間培養した。

得られた培養液をBS培地200mlを含む三角フラスコ(120℃で30分間殺菌済み)2本にそれぞれ10mlずつ植菌し、28℃で24時間振とう培養を行ない前培養とした。

BS培地200ℓを30ℓジャーファーマンターに仕込み、120℃で30分間殺菌した後、冷却して前記前培養液400mlを植菌し、300rpm, 28℃で72時間培養した。培養終了後、菌体を濾過により除去し、培養液20ℓを得た。この培養液20ℓを限外濾過法により濃縮、精製して酵素液2ℓを得た。この酵素活性は240単位/mlであった。

シユークロース10kgに水67ℓを加えて溶解し、pHを5.0に調整後、酵素をシユークロース1g当り48単位添加して、50℃で48時間転移反応を実施した。転移反応終了後、100℃で15分間加熱して酵素を失活させた後、対固形分0.5%の活性炭を加えて脱色した。活性炭を除去

- 17 -

表 4

試料名	反応液中に生成したデキストラン(%)
シユークロース	490(100)*
転移糖 瓶 1	436(89)
瓶 2	298(61)
瓶 3	289(59)
瓶 4	201(41)
瓶 5	142(29)
瓶 6	44(9)

*()の数字はシユークロースからの不溶性デキストランの生成量を100とした場合の指数を表わす。

実施例 1

シユークロース5.0%, ペプトン1.0%, 肉エキス0.7%, NaCl 0.3%を含有するBS培地10mlをそれぞれ2本の試験管に分注し、120℃で30分殺菌後、これにアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) [The genus *Aspergillus*, ウイリアムス アンド ウイルキンス コーポレーション

- 16 -

後、アンバーライトIR・120BおよびアンバーライトIRA・411のイオン交換樹脂で処理し、次いで7.5% w/w濃度に濃縮して難う蝕性甘味料12kgを得た。

得られた甘味料の糖組成はグルコース26%, フラクトース2%, シユークロース18%, GF₂ 40%, GF₃ 14%であった。

実施例 2

実施例 1に記載の方法でフザリウム・リニ (*Fusarium lini* IAM 5008)を培養し、20ℓの培養液を得、これを限外濾過法により濃縮、精製して酵素液2ℓを得た。酵素活性は200単位/mlであった。

シユークロース3kgに水7ℓを加えて溶解し、pHを6.0とした後、酵素をシユークロース1g当り16単位添加して50℃で24時間転移反応を実施した。反応終了後、100℃で15分間加熱して酵素を失活させた後、対固形分0.5%の活性炭を加えて脱色し、イオン交換樹脂により脱塩し7.5% w/wまで濃縮して難う蝕性甘味料3.7kgを

- 18 -

昭和55年12月12日

特許庁長官 島田 春樹 殿

得た。

この甘味料の糖組成はグルコース38.2%, フラクトース7.8%, シュクロース17.2%, GF₂ 25.4%, GF₃ 11.4%であった。

実施例3

実施例1に記載の方法でグレースポリウム・カキ (*Glossosporium kaki* IAM 5011) を培養し、200の濾液を得た。これを限外濾過法により濃縮、精製して酵素液1.50を得た。酵素活性は200単位/mlであった。

シュクロース3kgに水70を加えて溶解し、pHを6.0とした後、酵素をシュクロース1g当たり20単位添加して50℃で24時間転移反応を実施した。反応終了後、100℃で15分間加熱して酵素を失活させた後、実施例1と同様の方法により脱色、脱塩して75% w/wまで濃縮し、難う蝕性甘味料3.8kgを得た。

得られた甘味料の糖組成はグルコース25%, フラクトース9%, シュクロース36%, GF₂ 24%, GF₃ 6%であった。

- 19 -

成物は、」を「オリゴ糖の組成物を用いることが好ましく、更にこのような組成物にソルビトール、マンニトール、マルチトール等の難う蝕性糖アルコール類並びにデヒドロカルコン、ステビオサイド等の人工甘味料を添加して用いることもできる。又、シュクロースにフラクトシルトランスフェラーゼを作用して得られる糖組成物水溶液のpHを7~9に調整した後、固形物に対し3~10%のニッケル触媒を加え、反応温度50~130℃、反応水素圧50~120kg/cm²の条件で接触還元を行い組成物中のグルコース、フラクトースのみを選択的に接触還元することによつて、これ等単糖類をソルビトール、マンニトールに変換して使用することもできるが、このような処理の結果得られた糖アルコールを含む組成物は、例えばソルビトール37%, マンニトール2%, シュクロース10%, GF₂ 22%, GF₃ 22%, GF₄ 7%の組成を有するが、このような組成物からは口中微生物による不溶性デキストランの生成が認められず、有機酸の生成も少ないので、より難う蝕性効果の

1. 事件の表示

特願昭55-40193

2. 発明の名称

甘味料およびその製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

(609) 明治製菓株式会社

4. 代理人

〒103

東京都中央区日本橋本町1丁目5番地

共同ビル(新仲通り)6階

(7407) 弁理士 久保田 藤 郎



5. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

6. 補正の内容

(1) 明細書の第4頁4~6行目の「オリゴ糖の組成物を用いることが好ましく、」を「オリゴ糖の組成物を用いることが好ましく、更にこのような組成物にソルビトール、マンニトール、マルチトール等の難う蝕性糖アルコール類並びにデヒドロカルコン、ステビオサイド等の人工甘味料を添加して用いることもできる。又、シュクロースにフラクトシルトランスフェラーゼを作用して得られる糖組成物水溶液のpHを7~9に調整した後、固形物に対し3~10%のニッケル触媒を加え、反応温度50~130℃、反応水素圧50~120kg/cm²の条件で接触還元を行い組成物中のグルコース、フラクトースのみを選択的に接触還元することによつて、これ等単糖類をソルビトール、マンニトールに変換して使用することもできるが、このような処理の結果得られた糖アルコールを含む組成物は、例えばソルビトール37%, マンニトール2%, シュクロース10%, GF₂ 22%, GF₃ 22%, GF₄ 7%の組成を有するが、このような組成物からは口中微生物による不溶性デキストランの生成が認められず、有機酸の生成も少ないので、より難う蝕性効果の

高い甘味料となる(試験例4参照)。シュクロースにフラクトシルトランスフェラーゼを作用して得られる転移糖組成物は、」に訂正する。

(2) 同第16頁下から8行目と同7行目の間に次の文を加入する。

「試験例4

ストレプトコッカス・ムタンズ (*Streptococcus mutans* Serotype C) をマルトース0.27%, L-システイン・塩酸塩0.01%, L-グルタミン酸ナトリウム塩0.1%, NH₄HPO₄ 0.2%, MgSO₄·7H₂O 0.02%, NaCl 0.001%, MnSO₄ 0.01%, FeSO₄·7H₂O 0.01%, を含む培地で嫌氣的条件下に培養した後、遠心分離によつて菌体を集め、0.05M-磷酸バッファー中に10mg/mlとなるように分散する。乳酸生成量は0.2M-磷酸バッファー0.9ml, 2.25M-MgCl₂ 0.4ml, 1.7%糖液0.2ml, 菌体分散液0.5mlを混合し、37℃で30分間振盪反応を行った後、15分間煮沸して反応を停止し、遠心分離法によつて菌体を除去後、上清の乳酸量を酵素法により定量した。

表 5

基 質	乳酸 μmol /反応液	生 成 比
シユークロース	16.8	100
GF ₂	8.0	48
GF ₃	0.1	0
組成物-1 ^{*1}	12.6	75
組成物-2 ^{*2}	3.7	22

・1 組成物-1 (シユークロースにフラクトシ
ルトランスフェラーゼを作用して得られ
る組成物)

グルコース 37%, フラクトース 2%, シユ
ークロース 10%, GF₂ 22%, GF₃ 23%,
GF₄ 6%

・2 組成物-2 (接触還元によつて得られた組
成物)

ソルビトール 38%, マンニトール 1%, シ
ユークロース 10%, GF₂ 22%, GF₃ 23%,
GF₄ 6%」

(3) 同第19頁般終行の後に次の文を加入する。

— 4 —

当り60単位添加して、50℃で72時間転移反
応を実施した。転移反応終了後、100℃で15分
間加熱して酵素を失活させた後、対固形分0.5%
の活性炭を加えて脱色した。活性炭を除去後、ア
ンバーライト IR-120B, およびアンバーライト
IRA-411のイオン交換樹脂で処理し、75% w/w
濃度に濃縮して6kgの甘味料を得た。この甘味料
の糖組成はグルコース 37%, フラクトース 2%,
シユークロース 10%, GF₂ 22%, GF₃ 23%,
GF₄ 6%であつた。

上記甘味組成物 1.3 kg に水 700 ml を加え、これ
に 10% Na₂HPO₄ 1.5 ml を添加し、4% NaOH で pH 9.0
に調整した。これにラネーニッケル 50 g を加え、
反応温度 80～90℃, 水素圧 60～120 kg/cm²
で50分間攪拌しながら反応させた。反応終了後、
ニッケル触媒を除去し、アンバーライト IR-120B
およびアンバーライト IRA-411のイオン交換樹脂
で処理し、75% w/w に濃縮して製品 1 kg を得た。
この甘味料の糖組成はソルビトール 38%, マン
ニトール 2%, シユークロース 9%, GF₂ 22%,

「実施例 14

シユークロース 5%, ペプトン 1%, 肉エキ
ス 0.7%, NaCl 0.3% を含有する BS 培地 10 ml を
それぞれ2本の試験管に分注し、120℃で30分
殺菌後、これにアスペルギルス・ニガーを1白金
耳植菌し、28℃で24時間培養した。

得られた培養液を BS 培地 200 ml を含む三角フ
ラスコ (120℃で30分間殺菌済み) 2本にそれ
ぞれ10 ml ずつ植菌し、28℃で24時間振とう
培養を行ない前培養とした。

BS 培地 2.0 l を 3.0 l ジャーファーマンター
に仕込み、120℃で30分間殺菌した後、冷却し
て前記前培養液 400 ml を植菌し、300 r.p.m.,
28℃で72時間培養した。培養終了後、菌体を
濾過により除去し、培養濾液 2.0 l を得た。この
培養濾液 2.0 l を限外濾過法により濃縮、精製し
て酵素液 2.0 l を得た。この酵素活性は 240 単位/ml
であつた。

シユークロース 5 kg に水 3.3 l を加えて溶解し、
pH を 6.0 に調整後、酵素をシユークロース 1 g

— 5 —

GF₃ 23%, GF₄ 6% であつた。」

(以 上)

昭和56年6月10日

特許庁長官 島田 春樹 殿

1. 事件の表示

特願昭55-40193

2. 発明の名称

甘味料およびその製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

(609) 明治製菓株式会社

4. 代理人

〒103

東京都中央区日本橋本町1丁目5番地

共同ビル（新仲通り）6階

(7407) 弁理士 久保田 藤 郎

5. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

6. 補正の内容

- (1) 明細書第9頁最下行～第10頁2行目の「 α -D-フラクトフラノシル-(2→(1- α -D-フラクトフラノシル)₂→1)- α -D-

- 1 -

- (3) 同第16頁下から8行目と同7行目との間（昭和55年12月12日付提出の手続補正書第3頁4行目から第4頁下から2行目までの補正の内容(2)において、明細書に加入した試験例4の後）に次の文章を加入する。

「試験例5

体重3kgのウサギの小腸粘膜から Y. Takano の方法（ジャーナル オブ バイオケミストリー，第65巻，第545頁，1969年）にしたがつて、小腸二糖類分解酵素を調製した。この粗酵素系にはシユクラーゼ活性として 280U/ml，マルターゼ活性が540U/ml，トレハラーゼ活性8U/mlが夫々含まれていた。

5%濃度の基質1.0ml，0.25M 磷酸緩衝液（pH6.5）1.0ml，上記粗酵素液0.5mlを加え37℃で24時間反応させた後、ウォーターズ社製の μ Bondapakck OH カラムを装置した高速液体クロマトグラフィー法で分解率を求めた。なお溶剤系はアセトニトリル：水＝75：25のものをを用いた。結果を表-6に示す。

- 3 -

特開昭56-154967(8)

グルコピラノシド」を「 α -D-フラクトフラノシル-(2→(1- α -D-フラクトフラノシル)₂→1)- α -D-グルコピラノシド」に訂正する。

- (2) 同第10頁9行目の「...がある」と同10行目の「次に、...」との間に次の文章を加入する。

「なお、GF₂のうちの α -D-フラクトフラノシル-(2→1)- α -D-フラクトフラノシル-(2→1)- α -D-グルコピラノシド（以下、1-ケストースと称する。），GF₃のうちの α -D-フラクトフラノシル-(2→(1- α -D-フラクトフラノシル)₂→1)- α -D-グルコピラノシド（以下、ニストースと称する。）およびGF₄の α -D-フラクトフラノシル-(2→(1- α -D-フラクトフラノシル)₂→1)- α -D-グルコピラノシドは後記試験例5および試験例6で示す如く低カロリーであることが推定される。」

- 2 -

なお、分解率は下記の式により求めた。

$$\text{分解率(\%)} = 100 - \frac{24\text{時間反応後の反応液固型分総重量}}{\text{に対する残存基質の重量}}$$

表 - 6 ウサギ小腸二糖類分解酵素による分解

基 質	分 解 率
蔗 糖	100
マルトース	100
1-ケストース	0
ニストース	0
1F-フラクトフラノシル-ニストース	0

表-6に示すように1-ケストース，ニストースおよび1F-フラクトフラノシル-ニストースはウサギの小腸二糖類分解酵素によつてまったく分解されなかつた。

試験例6

体重170gのウイスター系雄ラット（1群30匹）を17時間絶食させた後、各種糖類を3g/kgの割合で経口投与し、投与後、30分，60分，90分，120分および180分で夫々6匹より採血

- 4 -

を行い、グルコースオキシダーゼ法で血中のグルコース量を定量した。結果を表-7に示す。

表 - 7 絶食ラットにおける血糖値の変化

	30分	60分	90分	120分	180分
非投与区	100	100	100	100	100
蔗糖	287	254	221	163	177
グルコース	341	286	185	163	163
フラクトース	236	252	246	232	183
1-kestose	139	122	121	123	123
ニストース	123	109	106	108	119
1P-フラクトフラノシル-ニストース	120	109	104	110	109

なお、表中の各数値は非投与区の血糖 (mg/dL) を100としたときの比較値で示した。非投与区の血糖値は30分, 60分, 90分, 120分, 180分で夫々 61 ± 4.3 , 65 ± 5.0 , 67 ± 2.3 , 73 ± 7.0 , 64 ± 3.7 であつた。

表-7から明らかなように、1-kestose, ニストースおよび1P-フラクトフラノシル-ニストースからの血糖の上昇は認められなかつた。

このことは本発明のフラクトオリゴ糖が体内で吸収されず、したがつて実質的にはカロリーとならないことを示している。」

(以 上)



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C07H 3/06, A23L 1/30, 1/236 C08B 37/18, C12P 19/18	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 91/13076 (43) Date de publication internationale: 5 septembre 1991 (05.09.91)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/BE91/00014 (22) Date de dépôt international: 22 février 1991 (22.02.91) (30) Données relatives à la priorité: 9000213 23 février 1990 (23.02.90) BE (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RAFFINERIE TIRLEMONTTOISE S.A. [BE/BE]; Avenue de Tervuren 182, B-1150 Bruxelles (BE). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : COUSSEMENT, Paul [BE/BE]; Maria-Theresiastraat 100, B-3000 Leuven (BE). DE LEENHEER, Leen [BE/BE]; Jezus Eiklaan 64, B-3080 Tervuren (BE). SMITS, Georges [BE/BE]; Dr. De Cockstraat 16, B-9308 Gijzegem-Aalst (BE). (74) Mandataire: VAN MALDEREN, Michel; Office Van Malderen, Avenue J.-S. Bach 22/43, B-1080 Bruxelles (BE).		(81) Etats désignés: AT, AT (brevet européen), AU, BB, BE (brevet européen), BF (brevet OAPI), BG, BJ (brevet OAPI), BR, CA, CF (brevet OAPI), CG (brevet OAPI), CH, CH (brevet européen), CM (brevet OAPI), DE (modèle d'utilité), DE (brevet européen), DK, DK (brevet européen), ES, ES (brevet européen), FI, FR (brevet européen), GA (brevet OAPI), GB, GB (brevet européen), GR (brevet européen), HU, IT (brevet européen), JP, KP, KR, LK, LU, LU (brevet européen), MC, MG, ML (brevet OAPI), MR (brevet OAPI), MW, NL, NL (brevet européen), NO, PL, RO, SD, SE, SE (brevet européen), SN (brevet OAPI), SU, TD (brevet OAPI), TG (brevet OAPI), US. Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(54) Title: BRANCHED FRUCTO-OLIGOSACCHARIDES, A METHOD FOR OBTAINING THEM AND USES OF PRODUCTS CONTAINING THEM (54) Titre: FRUCTO-OLIGOSACCHARIDES RAMIFIÉS, PROCÉDE POUR LEUR OBTENTION ET UTILISATION DES PRODUITS LES CONTENANT (57) Abstract <p>Branched fructo-oligosaccharides consisting of a chain which comprises mainly fructose units and has a preferred chain length of 2 to 15 units, on which are fixed one or more side chains mainly composed of fructose units. The length of the side chain, which may be straight or branched, is of 1 to 10 units. A composition consisting of one or more of the above mentioned branched fructo-oligosaccharides and, particularly, mixtures comprising, apart from the branched fructo-oligosaccharides, other ingredients such as proteins, lipids or fatty acids, carbohydrates, fibres and other additives, are also described.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention concerne des fructo-oligosaccharides ramifiés composés d'une chaîne comprenant principalement des unités de fructose et d'une longueur de chaîne préférentielle de 2 à 15 unités, sur laquelle est fixée une ou plusieurs chaînes latérales formées principalement d'unités de fructose. La longueur de la chaîne latérale, qui peut être ramifiée ou non, varie de 1 à 10 unités. La présente invention concerne également une composition constituée d'un ou plusieurs fructo-oligosaccharides ramifiés selon l'invention et, plus particulièrement, des mélanges comportant outre le ou les fructo-oligosaccharides ramifiés d'autres ingrédients tels que des protéines, des lipides ou acides gras, des hydrates de carbone, des fibres et d'autres additifs.</p>		